

Методы рентгеновского флуоресцентного микроанализа и спектроскопии комбинационного рассеяния света для исследования гистологических срезов мышечных тканей

© И.А. Артюков,¹ Г.П. Арутюнов,² Д.О. Драгунов,² Н.Н. Мельник,¹ Д.Х.А. Панэке,¹ Е.В. Переведенцева,¹ А.В. Соколова,² В.В. Соколова¹

¹ Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН,
119991 Москва, Россия

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
117997 Москва, Россия
e-mail: iart@lebedev.ru

Поступило в Редакцию 7 апреля 2023 г.

В окончательной редакции 7 апреля 2023 г.

Принято к публикации 7 апреля 2023 г.

Представлены результаты исследования химического состава тканей миокарда и поперечно-полосатых мышц крыс на клеточном уровне с использованием комбинации методов рентгеновской спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света. Исследования спектров рентгеновской флуоресценции для выявления распределения неорганических материалов (Na, Si, Ca и др.) проводились на двух рабочих станциях синхротрона ELETTRA (Италия). Для поиска и идентификации органических соединений (липидов, амидов и полисахаридов) применялась инфракрасная спектроскопия комбинационного рассеяния света. Все эксперименты проводились на образцах парафинированных гистологических срезов в целях изучения особенностей образования натриевых депозитов в мышечных тканях.

Ключевые слова: рентгеновская микроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния света, гистологические срезы, химическая фиксация, натриевые депозиты.

DOI: 10.21883/JTF.2023.07.55752.75-23

Введение

Как известно, существует прямая связь между увеличением суточного потребления соли и ростом количества сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе с летальным исходом (см., например, [1]). Концепция возможного депонирования натрия в коже и мышечной ткани впервые была сформулирована в экспериментах в 70-х годах прошлого века. Позднее в своих работах немецкий исследователь Й. Титце предположил, что в организме существует осмотически-нейтральный натрий, который накапливается на отрицательно заряженных гликозаминогликанах (ГАГ) в интерстициальном пространстве мышечной ткани, в том числе миокарде [2].

В нашей предыдущей работе с использованием методов рентгеновской микроскопии на образцах миокарда крыс было показано избыточное содержание натрия в интерстициальной ткани, вызванное избыточным потреблением соли [3]. Цель настоящей работы — изучить возможности комплексного исследования методами рентгеновской и инфракрасной спектроскопии химического состава тканей поперечно-полосатой мускулатуры бедра и миокарда крыс с использованием серии неокрашенных гистологических срезов, подготовленных по стандартной технологии с фиксацией в парафине. Рентгеновская флуоресцентная микроскопия обладает высокой чувствительностью к наличию следов

химических элементов, в то время как инфракрасная спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) является эффективным инструментом идентификации и локализации органических соединений, что должно позволить, в конечном счете, подтвердить современную гипотезу о наличии депозитов неосмотического натрия, связанного с гликозаминогликанами в интерстиции [2].

Рентгеновская флуоресцентная микроскопия на основе синхротронного излучения успешно используется для проведения химического анализа различных биологических объектов с нанометровым пространственным разрешением, позволяющим визуализировать карту распределения химических элементов на клеточном и даже субклеточном уровне и выявить их патологию [4–6]. Необходимо отметить, что в мягком рентгеновском диапазоне излучения характеристических K -линий легких химических элементов (энергия фотонов до 1 keV) необходимо использовать в качестве подложек тонкие полимерные пленки и мембраны, а образцы должны быть фиксированы для использования в условиях сверхвысокого вакуума. Тонкие (3–4 μm) неокрашенные и высушенные гистологические срезы, приготовленные по стандартным медицинским методикам, удовлетворяют этому требованию. С другой стороны, стандартная химическая фиксация с использованием формалина и процедур проводки и парафинизации существенно усложняет поиск следов вымываемых легких элементов

и не позволяет использовать количественные методы для микроанализа приготовленных образцов. Поэтому в настоящей работе была разработана и использовалась сравнительная методика и параметрический анализ для обнаружения отличий и особенностей химического состава тканей разных групп лабораторных животных.

В дополнение к рентгеновской микроскопии такие же гистологические неокрашенные срезы исследовались методами спектроскопии КРС в инфракрасном диапазоне. Как известно, этот спектроскопический анализ дает ключ к определению молекулярной структуры веществ без использования какой-либо специфической химической маркировки и флуоресцентных красителей [7]. Отметим, что в последнее время наблюдается заметный рост использования метода КРС в биологических исследованиях, особенно в области биомедицины [8].

Как правило, значительные области спектра КРС, наблюдаемые в биологических образцах, попадают в диапазон волновых чисел $400\text{--}2000\text{ см}^{-1}$, связанных с колебаниями связей белков ($1500\text{--}1700\text{ см}^{-1}$), углеводов ($470\text{--}1200\text{ см}^{-1}$), фосфатных групп ДНК ($980, 1080$ и 1240 см^{-1}) и дополнительных клеточных биомолекул. Более высокочастотные колебания связей СН в липидах и белках можно наблюдать при более высоких волновых числах $2700\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ [9].

Главные трудности при анализе спектров КРС гистологических срезов заключаются в том, что фиксирующее вещество — парафин — имеет сильные пики в областях спектра с высокими волновыми числами. Эти пики можно обнаружить на $892, 1065, 1135, 1174, 1298, 1421, 1443$ и 1464 см^{-1} , где они частично накладываются на спектр КРС исследуемого образца биоматериала [10].

Вклад парафина в спектр комбинационного рассеяния можно исключить либо путем физико-химической депарафинизации самого образца, либо с помощью цифровой обработки спектра с вычитанием основных пиков парафина из измеренного спектра [11]. В [12] было показано, что химическая депарафинизация, как и сам процесс фиксации, оказывает заметное влияние на содержание липидов в образцах, и поэтому ее следует использовать с осторожностью при анализе данных, основанных на изменении липидов. Цифровая обработка спектров позволяет избежать указанной молекулярной модификации образца, но может ограничить количество областей для уверенной интерпретации.

Необходимо отметить, что многих проблем, связанных с химической фиксацией и вымыванием легких элементов можно было бы избежать при использовании техники криофиксации с быстрой заморозкой [13]. К сожалению, полная цепочка криогенных процессов „приготовление образцов — хранение — измерение“ в рамках нашего исследования невозможна.

Таким образом, в настоящей работе впервые решается задача комплексного исследования биологических образцов с использованием методов рентгеновской микроскопии, флуоресцентного микроанализа и спектроскопии комбинационного рассеяния света для определения

возможной связи между аккумуляцией связанного (неосмотического) натрия и особенностями распределения основных органических соединений, составных частей структуры межклеточного пространства. Как указано выше, указанное исследование направлено также на подтверждение или опровержение современной гипотезы [2] об образующихся химических связях катионов натрия с молекулами гликозаминогликана в рамках анализа влияния потребления соли на дисфункцию сердечной мышцы

1. Приготовление образцов

Пятнадцать самцов крыс рода Wistar в возрасте от 15 до 16 недель были разделены на две группы с одинаковым весом тела, $297.4\pm 68.4\text{ г}$ (группа нормального потребления соли) и $252.0\pm 67.4\text{ г}$ (группа избыточного потребления соли). Начиная с третьей недели, крысам давали разные диеты: высокосолевая группа получала около 2 мEq натрия в пищу на 200 г веса тела, низкосолевая группа — соответственно около 0.2 мEq . Через 8 недель образцы мышечной ткани у животных изымались и консервировались в формалине.

3-х микронные срезы ткани миокарда и мышцы бедра с фиксацией в парафине изготавливались в соответствии со стандартной гистологической процедурой. Для гистологического анализа срезы окрашивались и помещались на предметные стекла. Для рентгеновской микроскопии соответствующие срезы не окрашивались и фиксировались на тонкую пленку ULTRALENE толщиной $4\text{ }\mu\text{м}$, а для получения спектров КРС срезы помещались на предметное стекло с напыленным алюминиевым покрытием.

2. Методы

Рентгеновские исследования распределения неорганических материалов (Na, Si, Ca и др.) проводились на двух рабочих станциях синхротрона ELETTRA (г. Триест, Италия): станции рентгеновского флуоресцентного микроанализа МАГАТЭ-XRF и станции сканирующего рентгеновского микроскопа TwinMic. Станция МАГАТЭ-XRF использует излучение электронного пучка накопителя в поворотном магните. Для наших исследований энергия фотонов возбуждающего пучка составила 3.5 keV , размер рентгеновского пучка на образце при угле падения 45° составил около $100\times 200\text{ }\mu\text{м}$ при потоке $> 10^9\text{ photons/s}$. Спектры рентгеновского флуоресценции снимались с помощью кремниевой дрейфового детектора (SDD) Bruker Nano GmbH, XFlash 5030 со спектральным разрешением 131 eV на K-линии Mn. Конструкция спектрометра позволяла проводить двумерное сканирование образца для получения карты распределения ряда химических элементов, начиная с натрия [14].

Для получения карты распределения более легких элементов от углерода до магния с высоким про-

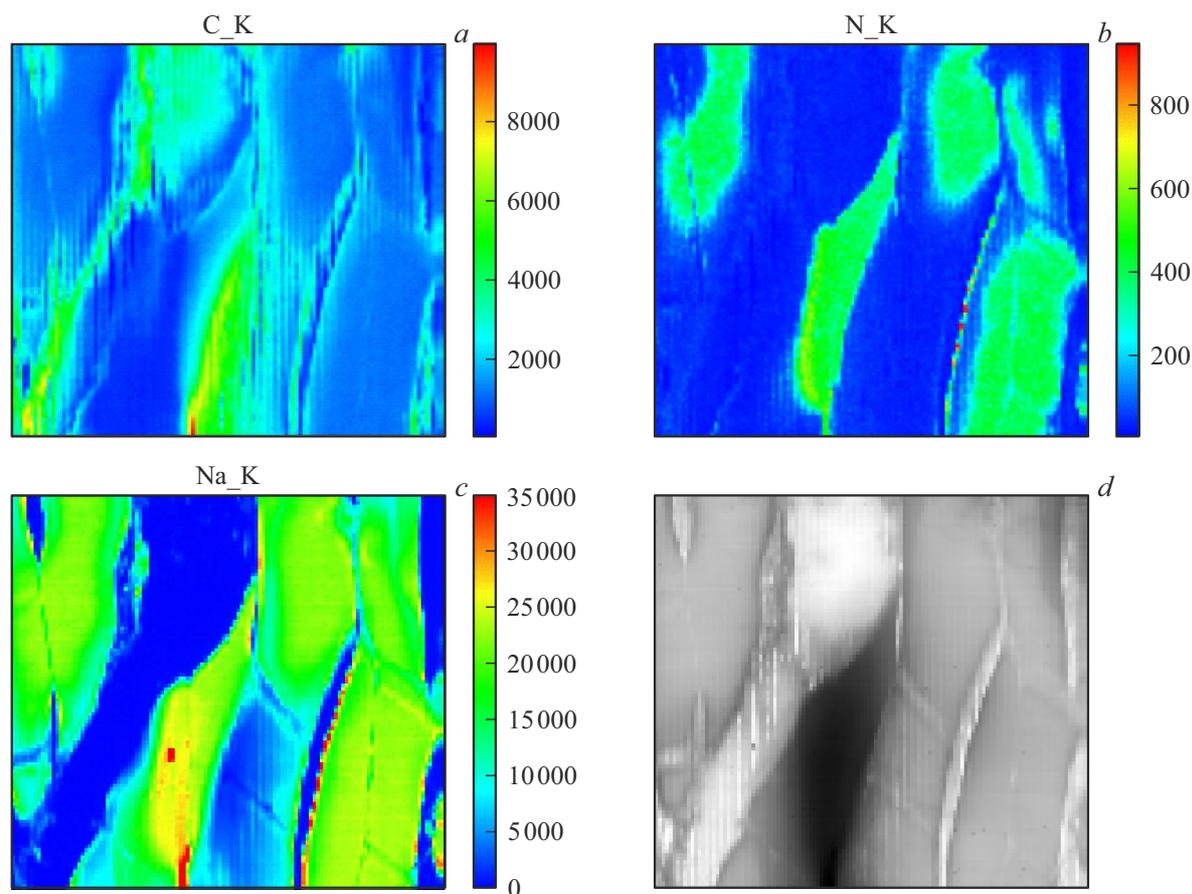


Рис. 1. Карты распределения атомов углерода (*a*), азота (*b*) натрия (*c*), а также рентгеновское абсорбционное изображение (*d*) среза поперечно-полосатой мышцы. Размер скана $300 \times 275 \mu\text{m}$.

пространственным разрешением $\sim 1 \mu\text{m}$ использовалась станция рентгеновской флуоресцентной микроскопии TwinMic [15]. Микроскоп работал в сканирующем режиме с энергией падающего рентгеновского пучка 1.472 keV . Одновременно с получением абсорбционных и фазово-контрастных рентгеновских изображений измерялся локальный спектр рентгеновской флуоресценции с помощью семи охлаждаемых детекторов SDD PNsensor, оптимизированных для мягкого рентгеновского диапазона. При сканировании области образца время записи рентгеновских спектров флуоресценции в одном пикселе изображения составляло $5\text{--}10 \text{ s}$. Для количественной обработки спектров использовались программа PyMCA и оригинальные написанные Python-скрипты.

Спектры комбинационного рассеяния измерялись с помощью спектрометра Renishaw In Via Raman Microscope (Renishaw, Великобритания), оснащенного диодным лазером с длиной волны 785 nm . В конструкцию прибора интегрирован конфокальный микроскоп, позволяющий получать изображение исследуемых образцов как в белом свете, так и на частотах комбинационного рассеяния света для составления карт распределения соединений с пространственным разрешением до $2 \mu\text{m}$. В наших экспериментах для получения

спектров и микроскопических изображений использовался объектив NPlan 50/0.50 с рабочим расстоянием 8 mm (Leica, Германия). Время измерения составляло 100 s , спектральное разрешение — 1 cm^{-1} . Мощность в фокусе уменьшалась $0.1\text{--}0.5\%$ от 45 mW исходной мощности лазерного пучка для предотвращения выжигания легкоплавкого материала среза. Измеренные ИК спектры анализировались с использованием программного обеспечения Renishaw (Renishaw FixtureBuilderx64) и Origin 8.5

3. Результаты

Полученные на синхротронных рабочих станциях данные по интенсивности рентгеновской флуоресценции при сканировании гистологических срезов были использованы для составления карт распределения в них различных химических элементов (рис. 1).

Рис. 2 показывает карту распределения натрия и железа в клетках и межклеточном пространстве (интерстиции) поперечно-полосатой мышцы бедра крысы. На рис. 2, *a* хорошо заметен пик точечной концентрации натрия в левой части межклеточного пространства, при этом наличие в межклеточном пространстве атомов

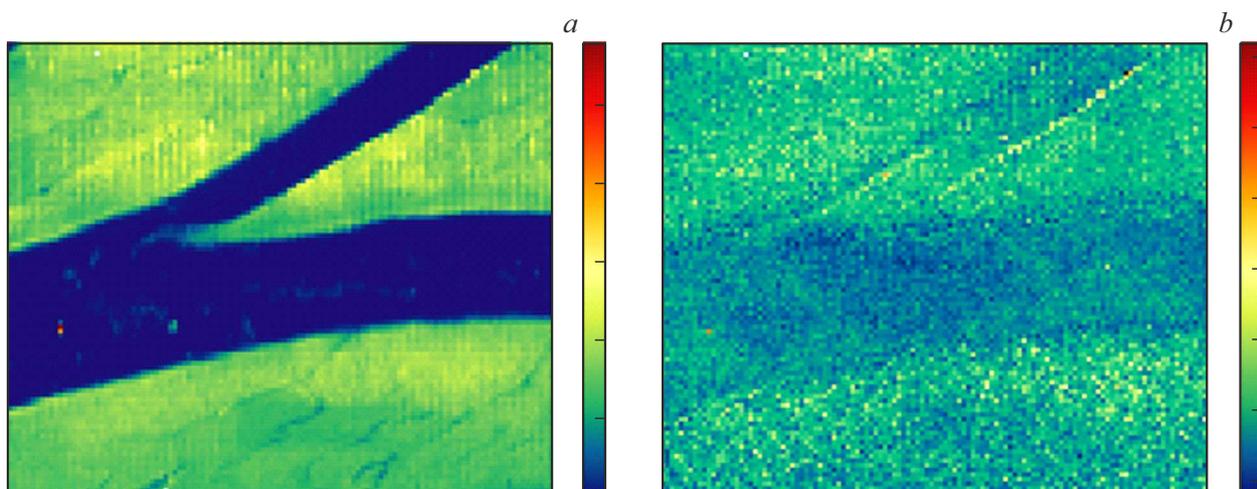


Рис. 2. Распределение натрия (*a*) и железа (*b*) в клетках и межклеточном пространстве (интерстиции) поперечно-полосатой мышцы бедра крысы. Синий цвет (в онлайн версии) указывает на межклеточное пространство. Размер скана $200 \times 200 \mu\text{m}$.

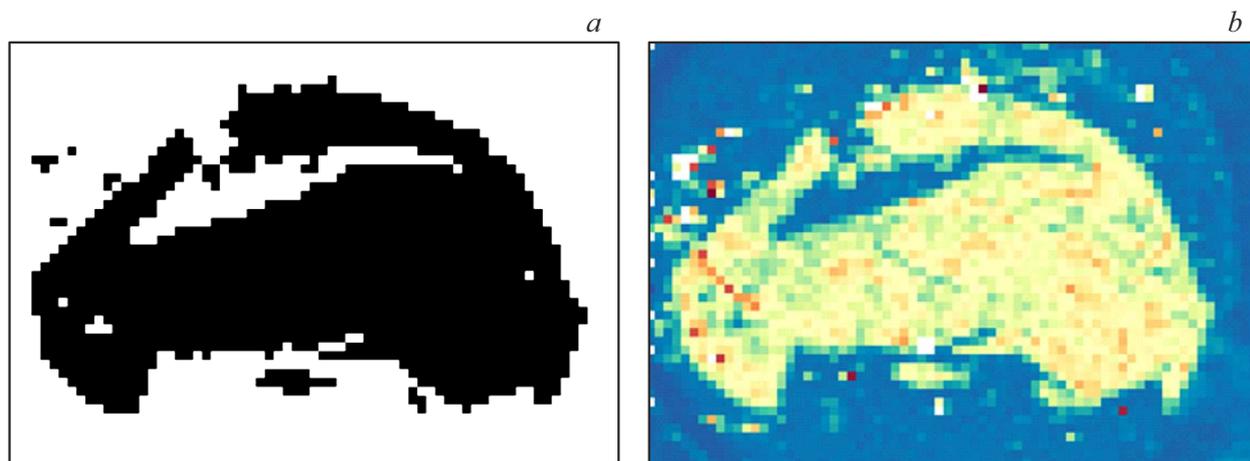


Рис. 3. Кластерная сегментация изображения для определения границ среза (*a*) с использованием карты распределения серы (*b*).

железа указывает на то, что в данном случае получено изображение элемента микроструктуры ткани — интерстиция, а не, например, разрывы, заполненные парафином (рис. 2, *b*).

Для процедуры сегментации карт распределения элементов использовался алгоритм агломеративной кластеризации по *K*-линиям серы и фосфора. В начале работы алгоритма каждый пиксель определялся как отдельный кластер. Далее алгоритм на каждом шаге соединял в одно целое кластеры с близкими значениями. Процедура заканчивалась, когда оставалось только двух кластеров, соответствующих пустой части пленки подложки и области исследуемого образца среза (рис. 3).

Рис. 4 демонстрирует результаты, полученные при измерении спектров КРС гистологического среза в клетках и на границе межклеточного пространства миокарда, в нескольких точках, отмеченных на изображении. В соответствующих характерных спектрах наблюдается

набор пиков, характерных для биологических образцов (клеток, тканей и т.п.) [9], который заметно отличается от наблюдаемого спектра парафина, присутствующего в образце. Широкая полоса в области $1600\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ является известной полосой/пиком Амид I и приписывается, в первую очередь, колебаниям пептидных связей (CN) в белках и протеинах, а также C=C-группы в ненасыщенных липидах и в углеводах. Полоса Амид I представляет собой суперпозицию полос, характерных для белков с различной вторичной структурой, поэтому ее детальный анализ позволяет судить о состоянии белка и влиянии его окружения на его свойства [16]. Можно предположить, что наблюдаемый сдвиг максимума пика Амид I для спектров, измеренных в клетках и на границе межклеточного пространства, связан с чувствительностью Амид I к ближайшему окружению белка и влиянию на него неоднородного распределения в тканях химических элементов.

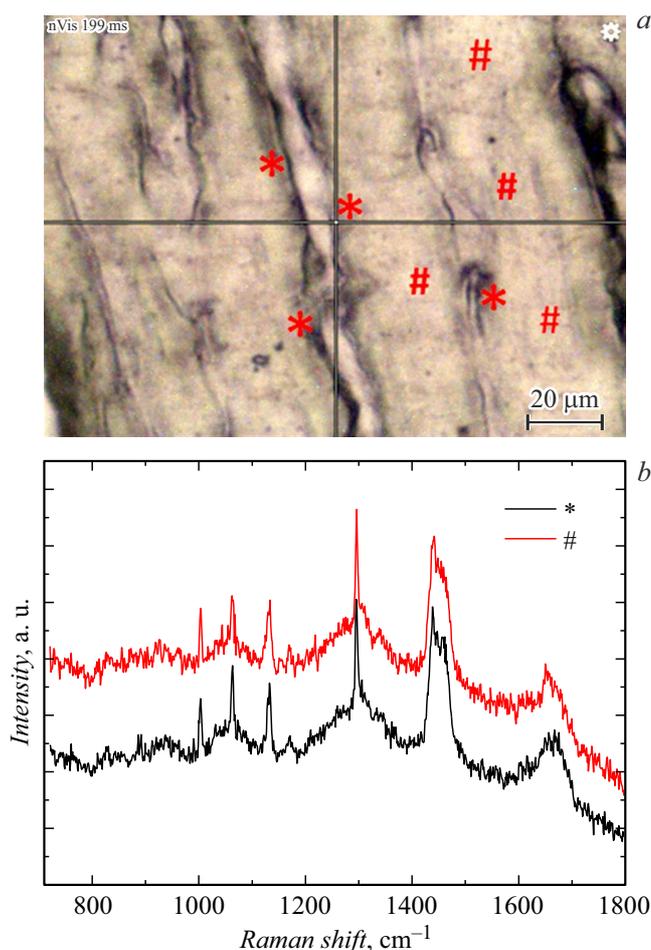


Рис. 4. Изображение неокрашенного гистологического среза с обозначенными местами измерения спектров КРС (а) и усредненные спектры, измеренные в этих точках (b).

Интенсивная полоса с максимумом около 1445 cm^{-1} возникает в результате колебаний СН-групп в липидах, а также колебаний в CH_2 - и CH_3 -группах в липидах и белках. В области $1200\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ наблюдается полоса Амид III, также принадлежащая белку. В интервале $1290\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$ видны колебания в группах СН- и CH_2 -липидов; в интервале $1020\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$ — в С—О- и С—О—Н-группах углеводов. В интервале $700\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ наблюдаемые колебания приписывают аминокислотам. В частности, узкая полоса при $1002\text{--}1004\text{ cm}^{-1}$ — это колебание ароматического кольца молекулы фенилаланина. Отметим, что ее интенсивность и положение максимума не чувствительны к конформационным изменениям белка и часто используется как опорная точка при анализе и калибровке спектров КРС как белков, так и биологических систем в целом [17].

Узкие пики на 1065 , 1135 и 1298 cm^{-1} , а также пики, дающие вклад в интенсивность сигнала КР в области $1440\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$, принадлежат парафину [10].

Заключение

Проведенные исследования в рентгеновском и инфракрасном спектральных диапазонах подтвердили возможность определения следов химических элементов и соединений, оставшихся после процедуры гистологической проводки и химической фиксации парафином. Высокое пространственное разрешение обоих спектроскопических методов позволяет составлять карты распределения различных биохимических веществ и следить за их особенностями, в частности при разностном исследовании образцов мышечной ткани, взятых у лабораторных животных, разделенных по группам. Так, при комплексном исследовании одного и того же участка образца ткани можно получить комплементарные данные о корреляции расположения неорганических элементов и биоорганических материалов, что позволяет выявить биохимические механизмы связывания легких катионов.

С помощью синхротронного излучения в работе были получены рентгеновские абсорбционные изображения на клеточном уровне срезов образцов различных типов мышечной ткани, и проведен анализ карт их химического состава для решения задачи поиска и идентификации натриевых отложений во внеклеточном пространстве.

Измерены локальные спектры КРС в различных точках гистологического среза: в клетках поперечно-полосатой мышцы и на границе межклеточного пространства. В спектрах отмечен набор пиков, характерных для биологических тканей, при этом максимум пика Амид I в спектрах, измеренных на границе межклеточного пространства, сдвинут относительно Амид I в спектрах клеток. Предполагается, что накопление натрия в межклеточном пространстве может влиять на Амид I благодаря его чувствительности к ближайшему окружению белка.

Таким образом, разработана основа новых методов комплексного исследования стандартных гистологических срезов на основе комбинации рентгеновской и инфракрасной аналитической микроскопии для поиска и идентификации как неорганических элементов, так и органических соединений.

Дальнейшее развитие комбинации нескольких спектроскопических методов биохимического анализа позволит существенно расширить область эффективного применения каждого метода и улучшить их информативность. Кроме того, разработка методик работы со стандартными гистологическими срезами существенно ускорит и упростит приготовление образцов и позволит собрать больше данных для статистического анализа.

Благодарности

Исследования по проекту №20195340 на синхротроне ЭЛЕТТРА проводились при финансовой поддержке МАГАТЭ в рамках Соглашения между МАГАТЭ и Синхротроном ЭЛЕТТРА-Триест. Авторы благодарны А. Джанончелли и С. Полластри за помощь в этой работе.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D. Mozaffarian, S. Fahimi, G.M. Singh, R. Micha, S. Khatibzadeh, R.E. Engell, S. Lim, G. Danaei, M. Ezzati, J. Powles. *NEJM*, **371**, 624 (2014). DOI: 10.1056/NEJMoa1304127
- [2] J. Titze, H. Krause, H. Hecht, P. Dietsch, J. Rittweger, R. Lang, K.A. Kirsch, K.F. Hilgers. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **283**, F134 (2002). DOI: 10.1152/ajprenal.00323.2001
- [3] I. Artyukov, G. Arutyunov, M. Bobrov, I. Bukreeva, A. Cedola, D. Dragunov, R. Feshchenko, M. Fratini, V. Mitrokhin, A. Sokolova, A. Vinogradov, A. Gianoncelli. *Sci. Rep.*, **11** (1), 22025 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-01443-8
- [4] T. Paunesku, S. Vogt, J. Maser, B. Lai, G. Woloschak, J. Cell. *Biochem.*, **99** (6), 1489 (2006). DOI : 10.1002/jcb.21047
- [5] C. Poiry-Yamate, A. Gianoncelli, B. Kaulich, G. Kourousias, A.W. Magill, M. Lepore, V. Gajdosik, R. Gruetter. *J. Neurosci. Res.*, **91** (8), 1050 (2013). DOI: 10.1002/jnr.23171
- [6] L. Merolle, M. Ragazzi, A. Gianoncelli, M. Altissimo, A. Ciarrocchi, D. Bedolla, C. Marraccini, R. Baricchi, T. Pertinhez. *JINST*, **13** (5), C05018 (2018). DOI: 0.1088/1748-0221/13/05/C05018
- [7] K. Ikemoto, K. Hashimoto, Y. Harada, Y. Kumamoto, M. Hayakawa, K. Mochizuki, K. Matsuo, K. Yashiro, H. Yaku, T. Takamatsu. *AHC*, **54** (2), 65 (2021). DOI: 10.1267/ahc.21-00016
- [8] H.J. Butler, L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N.J. Fullwood, B. Gardner, P.L. Martin-Hirsch. *Nat. Protoc.*, **11** (4), 664 (2016). DOI: 10.1038/nprot.2016.036
- [9] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **42** (5), 493, (2007). DOI: 10.1080/05704920701551530
- [10] A. Tfayli, C. Gobinet, V. Vrabie, R. Huez, M. Manfait, O. Piot. *Appl. Spectrosc.*, **63** (5), 564 (2009). DOI: 10.1366/000370209788347048
- [11] S.M. Ali, F. Bonnier, A. Tfayli, H. Lambkin, K. Flynn, V. McDonagh, C. Healy, T. Clive Lee, F.M. Lyng, H.J. Byrne. *J. Biomed. Opt.*, **18** (6), 061202 (2013). DOI: 10.1117/1.JBO.18.6.061202
- [12] M.M. Mariani, P. Lampen, J. Popp, B.R. Wood, V. Deckert. *Analyst*, **134** (6), 1154 (2009). DOI: 10.1039/b822408k
- [13] L. Merolle, L. Pascolo, L. Zupin, P. Parris, V. Bonanni, G. Gariani, S. Kenig, D.E. Bedolla, S. Crovella, G. Ricci. *Molecules*, **28** (4), 1992 (2023). DOI: 10.3390/molecules28041992
- [14] A.G. Karydas, M. Czyzycki, J.J. Leani, A. Migliori, J. Osan, M. Bogovac, P. Wrobel, N. Vakula, R. Padilla-Alvarez, R.H. Menk. *J. Synchrotron Radiat.*, **25** (1), 189 (2018). DOI: 10.1107/S1600577517016332
- [15] A. Gianoncelli, G. Morrison, B. Kaulich, D. Bacescu, J. Kovac. *Appl. Phys. Lett.*, **89** (25), 251117 (2006). DOI: 10.1063/1.2422908
- [16] A. Barth, C. Zscherp. *Q. Rev. Biophys.*, **35** (4), 369 (2002). DOI: 10.1017/S0033583502003815
- [17] C. Krafft, T. Knetschke, R.H.W. Funk, R. Salzer. *Anal. Chem.*, **78**, 4424 (2006). DOI: 10.1021/ac060205b